



## MÁSTER UNIVERSITARIO EN NEUROCIENCIAS RD 1393/2007

Instituto de Neurociencias De Castilla y León  
Universidad de Salamanca



Evaluación de un modelo bioquímico para cuantificar el  
dolor en vertebrados

**- TRABAJO DE FIN DE MÁSTER -**

Autora:  
**Isabel Ruiz Sánchez**  
**Graduada en Biología**

Tutora:  
**Verónica González Núñez**

Salamanca, 19 julio de 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer el apoyo recibido durante la realización de este trabajo a mi tutora Verónica González Núñez, por darme la oportunidad de realizarlo, por su entusiasmo y su esfuerzo en que este trabajo haya sido realmente constructivo en mi formación y a Andrés Ángel Calderón García, por su compañerismo, paciencia y disponibilidad.

## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
1.1 El dolor.....	1
1.2 Modelos animales de experimentación para medir el dolor .....	3
1.3 La problemática de la cuantificación objetiva del dolor.....	3
1.4 Nuevos modelos para la validación de fármacos analgésicos .....	4
1.5 El Pez cebra.....	4
2. Hipótesis y objetivos.....	6
3. Materiales y métodos .....	7
3.1 Mantenimiento de peces cebra adultos.....	7
3.2 Cruce, recogida huevos y cría de embriones .....	7
3.3 Exposición a estímulos potencialmente dolorosos .....	7
3.4 Exposición a fármacos potencialmente dolorosos.....	7
3.5 Estudio comportamental y alteraciones en el ritmo cardiaco .....	8
3.6 Obtención de muestras .....	8
3.7 Extracción y cuantificación de proteínas.....	8
3.8 SDS-PAGE y Western Blot.....	8
3.9 Obtención de imágenes y cuantificación.....	9
3.10 Análisis estadístico.....	9
4. Resultados.....	10
4.1 Estudio comportamental.....	10
4.2 Estudio de la frecuencia cardiaca .....	10
4.2.1 Alteraciones de la frecuencia cardiaca en función a la variación de temperatura .....	10
4.2.2 Alteraciones de la frecuencia cardiaca en función a la variación de pH .....	10
4.2.3 Alteraciones de la frecuencia cardiaca tras la incubación con capsaicina.....	10
4.3 Análisis de la expresión de cfos .....	11
4.3.1 Análisis de la expresión de cfos en función a la variación de temperatura .....	11
4.3.2 Análisis de cfos en función a la variación de pH .....	12
4.3.3. Análisis de expresión de cfos en embriones control y expuestos a kainato .....	12
4.3.4. Análisis de expresión de cfos en embriones control y expuestos a capsaicina .....	13
5. Discusión .....	15
6. Conclusiones.....	19
7. Bibliografía.....	20

## **TÍTULO: Evaluación de un modelo bioquímico para cuantificar el dolor en vertebrados**

**Autora:** Isabel Ruiz Sánchez **Tutora:** Verónica González Núñez

### **RESUMEN**

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo animal vertebrado utilizado en numerosos campos de investigación científica, entre ellos el del dolor. Hasta el momento no se dispone de una herramienta eficaz para cuantificar el dolor, por lo que es necesario continuar la búsqueda de métodos que permitan determinar de manera exacta el grado de dolor. En el presente trabajo se propone que los embriones de pez cebra de 72 horas post-fecundación (hpf) son una herramienta para la cuantificación de la sensación dolorosa. Para ello, los embriones de pez cebra se expusieron de manera aguda a los siguientes estímulos potencialmente dolorosos: temperatura elevada (39 °C), pH bajo (5.75), capsaicina y kainato (en dosis 100 µM, 10 µM, y 1 µM). Posteriormente se han analizado los cambios en el comportamiento producidos por estos estímulos, y la expresión de cfos se ha cuantificado mediante Western Blot en embriones control y aquellos expuestos a estímulos potencialmente dolorosos. De acuerdo con los resultados obtenidos, la exposición a kainato a una dosis 1 µM y la incubación a pH bajo (5.75) son las aproximaciones más prometedoras para generar una sobreexpresión de cfos como respuesta a la activación del sistema nociceptivo en embriones de pez cebra. Por tanto, hemos desarrollado una metodología válida para la determinación de cambios bioquímicos producidos por estímulos dolorosos. La realización de futuros experimentos de analgesia que completen este trabajo nos permitirá desarrollar este método como la primera herramienta capaz de cuantificar objetivamente el dolor en pez cebra.

**Palabras clave:** cuantificación del dolor, estímulo doloroso, pez cebra, cfos, sobreexpresión génica.

### **ABSTRACT**

Zebrafish (*Danio rerio*) is recognized as non-mammalian vertebrate model organism which is used in many different fields of research, including pain research. Nowadays, there is no effective tool to measure pain perception, so that it is necessary to find a novel approach to accurately determine the degree of pain. In this assay, we propose that zebrafish embryos of 72 hours post-fertilization (hpf) are an ideal tool to quantify pain. Zebrafish embryos were acutely exposed to the following potential noxious stimuli: high temperature (39 °C), low pH (5.75), capsaicin and kainate (at doses 100 µM, 10 µM, and 1 µM). We have analysed the behavioural responses elicited by these stimuli, and the expression of cfos was assessed by Western Blot in control and treated embryos. Our results indicate that exposure to 1 µM kainate and incubation at low pH (5.75) are the most promising approaches to induce the up-regulation of cfos as a response to the activation of the nociceptive system in zebrafish embryos. Thus, we have developed a valid methodology to determine the biochemical changes induced by noxious stimuli. Future directions will include analgesic assays that complete this work, and it will allow us to develop this method as the first tool to objectively evaluate pain in zebrafish.

**Key words:** pain quantification, noxious stimulus, zebrafish, cfos, up-regulation.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El dolor

Actualmente la IASP (International association for the Study of Pain) define dolor como *“Una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial que incluye una serie de conductas relacionadas con el dolor, visibles o audibles, que pueden ser modificadas por el aprendizaje (Merskey, H., 2007)”*. En los últimos años el dolor se ha considerado como un quinto signo vital, al igual que la temperatura, respiración, frecuencia cardíaca y presión arterial, debido a que los niveles de estos signos son clave para el bienestar personal y además pueden variar a lo largo del tiempo (Casey, G., 2011). No obstante, la gran dificultad de la cuantificación del dolor, ya que no existe ningún instrumento objetivo y eficaz para su medición, hace que se considere un signo vital poco fiable.

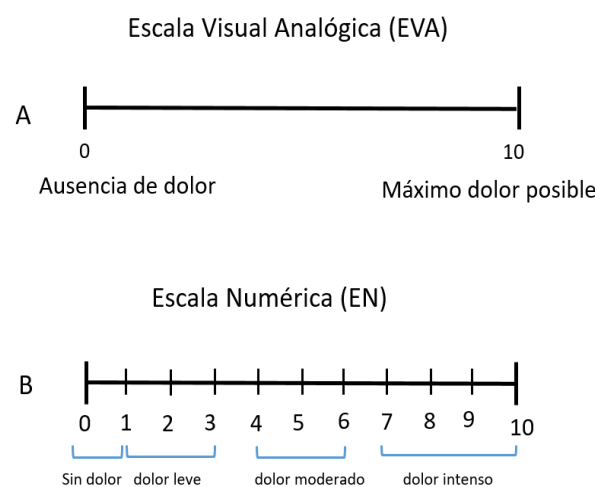
El dolor, que se puede percibir como sensaciones irritantes, punzantes o de quemazón, es uno de los primeros síntomas que el organismo percibe cuando se encuentra en una situación de anomalía funcional o en la que su integridad corre peligro. Por tanto, el dolor tiene una función protectora. Por otra parte, la nocicepción es la transmisión de señales de lesión tisular o irritación que se perciben normalmente en forma de dolor o picor. La nocicepción está modulada por factores psicobiológicos, y se puede percibir o no como dolor, dependiendo del entorno, el ámbito cultural y hábitos familiares.

El dolor se puede clasificar de múltiples formas en función a su localización y distribución, a su duración y/o periodicidad, signos asociados o síntomas. Uno de los sistemas más útiles a la hora de clasificar el dolor es la clasificación mecanística que define tres tipos de dolor: nociceptivo, inflamatorio y neuropático (Cerveró, F., & Laird, J., 1991). El dolor nociceptivo es originado por una lesión que activa el sistema nociceptivo durante un corto periodo de tiempo, y se percibe en forma de dolor o picor. El dolor inflamatorio se debe a la estimulación nociva y prolongada en el tiempo que induce un daño tisular, y el dolor neuropático se produce por lesión directa de nervios en el sistema nervioso central o periférico. El dolor nociceptivo, que se percibe en forma de dolor o picor como repuesta a una lesión tisular, es de vital importancia para la supervivencia y el bienestar de nuestro organismo (Cerveró, F., 2008). El dolor también se puede clasificar como dolor agudo y crónico. El dolor agudo es un dolor puntual, generalmente de corta duración, que suele estar asociado a una lesión o patología y normalmente no deriva en un problema clínico. El dolor crónico se mantiene en el tiempo más de lo que duraría una señal fisiológica de alarma, puede tener causa real o no existir causa aparente. El dolor crónico supone una reprogramación de la actividad neurológica que implica cambios morfológicos y químicos, generando como resultado una respuesta nerviosa alterada; ésto hace que sea más complicado tratar este tipo de dolor. Además, el principal problema de los estímulos dolorosos es que, al contrario de lo que sucede con otros tipos de estímulos, como el acústico o visual, no tiene capacidad de adaptación sensorial; es decir, la sensación dolorosa no se adapta con el tiempo,

sino que empeora (Cerveró, F., 2008). Aquellos pacientes que conviven con el dolor presentan un deterioro significativo de su calidad de vida, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al dolor crónico como una patología por sí mismo y existen unidades especializadas en su tratamiento. Su principal desventaja es que el dolor persistente suele ser refractario a los tratamientos y se pueden desarrollar comorbilidades como trastornos del sueño, ansiedad, depresión y aislamiento social.

El dolor tiene un componente altamente subjetivo, y existen varios factores psicológicos y físicos que modifican la percepción sensorial. La percepción dolorosa es diferente en cada persona según su umbral de tolerancia, nivel cognitivo, personalidad, sexo, edad o aspectos culturales. Actualmente se utilizan escalas subjetivas para medir el grado de dolor, principalmente las escalas unidimensionales, en las que se proporciona al paciente una escala simple para cuantificar la intensidad del dolor mediante descriptores visuales o escalas numéricas. Destacan la escala numérica (EN) y escala visual analógica (EVA) (Figura 1). También existen escalas con un enfoque multidimensional, pero apenas son utilizadas ya que son test muy extensos, en los que se tienen en cuenta dimensiones afectivas, sensoriales, efectos del dolor en la vida diaria del paciente, eficacia del tratamiento etc.

Aunque en la actualidad se utilicen las escalas unidimensionales como el principal instrumento para la evaluación del dolor existen grupos poblacionales como niños o personas de avanzada edad que pueden encontrar dificultades a la hora de evaluar un dolor. También pueden existir barreras culturales, educacionales o de lenguaje, y existe la posibilidad de que no se le proporcione al paciente la escala apropiada para su dolor o grupo poblacional. Asimismo es clave la habilidad del observador para encontrar comportamientos o indicadores dolorosos. Teniendo en cuenta la falta de objetividad y a pesar de los grandes avances de la medicina en las últimas décadas, es necesario buscar un método objetivo para cuantificar el grado de dolor.



**Figura 1. Escalas unidimensionales para medir el dolor.** (A) Escala visual analógica (EVA): se representa una línea de 10 cm de longitud sin marcas en la que el paciente debe indicar el punto de la línea que mejor refleje el dolor que padece. (B) Escala numérica (EN): se representa una línea de 10 cm de longitud con 10 marcas separadas 1 cm entre sí, en la que el paciente debe indicar el punto de la línea que mejor refleje el dolor que padece.

### 1.2 Modelos animales de experimentación para medir el dolor

Dado la complejidad para cuantificar el dolor y la variabilidad signos y síntomas que presenta, es complicado elaborar un modelo animal para cuantificar el grado de dolor. La determinación de la existencia de dolor en animales es difícil y los modelos actuales suelen centrarse en aspectos comportamentales muy concretos, en los que los resultados conllevan un grado de variabilidad muy amplio. Por otra parte, es complicado conocer las sensaciones dolorosas del animal, por lo que solo podemos estudiar las reacciones frente a un estímulo doloroso.

Los principales animales utilizados para medir el dolor, tanto agudo como crónico, son la rata y el ratón, para los que existen test basados en estímulos físicos o químicos y se determina la latencia en la respuesta del animal. Algunos ejemplos de test para medir el dolor en animales son el test de la placa caliente (*hot plate test*), el test de presión de la pata o cola (*paw / tail pressure*), test de retirada de la cola (*tail flick test*), el test de estimulación eléctrica en la cola (*electric stimulation of the tail*), el test del ácido acético (*abdominal constriction test*) o el test de la formalina (*formalin test*) (Micó, J., & Ortega-Álvaro, A., 2006).

Por otra parte, a la hora de experimentar *in vivo* en el campo del dolor y la nocicepción, hay que tener en cuenta las limitaciones éticas y científicas que se presentan. Las ratas y ratones son los modelos referencia para estos campos, siendo adecuados para la manipulación genética (Malafoglia et al., 2014). No obstante, en las últimas décadas el uso del pez cebra en la investigación ha ido creciendo y actualmente existen una serie de test comportamentales tanto para pez cebra adulto como para larvas y embriones.

### 1.3 La problemática de la cuantificación objetiva del dolor

La medicina siempre ha tratado de buscar un remedio definitivo como tratamiento contra el dolor. Pese a que en los últimos años se ha avanzado en el estudio del dolor y la analgesia, todavía no existe un tratamiento eficaz para algunos dolores como el canceroso, neuropático o crónico, principalmente debido a que aún se necesita conocer la implicación de los distintos sistemas de neurotransmisores, y los efectos en la plasticidad sináptica relacionados con el dolor. Hasta el momento no se dispone de una herramienta o método eficaz para medir el dolor, por lo que es necesaria la búsqueda de métodos que permitan determinar de manera exacta el grado de dolor experimentado por el paciente, para así mejorar tanto el diagnóstico como la eficacia del tratamiento empleado. Una posibilidad es la utilización de genes marcadores de dolor.

En estudios recientes en modelos de dolor en mamíferos, han identificado un conjunto de genes denominados genes marcadores de dolor o PMG (de sus siglas en inglés *Pain Marker Genes*), que son activados después de experimentar un dolor neuropático o inflamatorio, como por ejemplo VIP, cfos, cjun o BDNF (Malafoglia et al., 2014). Existe la familia de genes fos de expresión temprana denominados IEG (*Immediate Early Genes*), en la que están incluidos cfos, fosb, fra1, y fra2. La familia Fos se heterodimeriza junto a la familia de proteínas Jun (cjun, junb o jund) formando factor el

transcripción AP-1 (proteína activadora 1), proteína capaz de activar la transcripción de genes implicados en la proliferación y diferenciación celular que presentan la secuencia de reconocimiento TGAC / GTCA. Las proteínas de la familia Fos se inducen específicamente en algunas regiones cerebrales como núcleo accumbens y núcleo estriado dorsal, que son zonas mediadoras de la actividad locomotora y de las respuestas conductuales en respuesta a fármacos y a sus efectos de recompensa (Nestler, E., 2001). Estudios previos han demostrado que en peces (*Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oryzias latipes* y *Poecilia reticulata*) existe actividad electrofisiológica en el prosencéfalo, mesencéfalo y cerebro posterior en respuesta a la estimulación dolorosa. Además, se han identificado genes implicados en respuestas iniciales o tempranas al dolor. Por lo tanto, un estímulo nocivo provoca cambios moleculares, fisiológicos y funcionales en los peces (Sneddon, L., 2011). En el presente trabajo, se analiza la expresión de cfos y genes de la misma familia mediante estudios Western Blot.

#### 1.4 Nuevos modelos para la validación de fármacos analgésicos

En los últimos años se ha incrementado el uso de peces en estudios sobre el dolor y la nocicepción. Trabajos muy recientes apuntan a que los peces teleósteos tienen nociceptores capaces de detectar estímulos dolorosos y poseen un sistema de procesamiento nociceptivo central y periférico similar al que se puede encontrar en mamíferos (Lopez-Luna, J., et al 2017). De hecho, se ha evaluado el efecto de fármacos analgésicos sobre el comportamiento de larvas de 5 días post-fecundación (dpf) tras la exposición a estímulos potencialmente dolorosos. Investigaciones previas indican que la actividad del sistema opioide endógeno del pez cebra es muy similar, tanto bioquímica como farmacológicamente, al sistema opioide de los mamíferos (Gonzalez-Nunez , V., & Rodríguez, R., 2009). Por tanto, el pez cebra puede ser un modelo muy útil para elucidar los mecanismos que controlan el dolor, los cambios bioquímicos responsables del desarrollo de la tolerancia y dependencia a fármacos analgésicos y además, puede considerarse como una herramienta valiosa para diseñar nuevos fármacos. El uso de los embriones como alternativa a la utilización de los individuos adultos en estudios experimentales, supondría un medio rápido para probar la eficacia de fármacos analgésicos y contribuir a la reducción y reemplazo de modelos murinos.

#### 1.5 El Pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleósteo de la familia de los ciprínidos, de origen tropical. Su tamaño adulto varía entre los 2.5 cm hasta 4 cm. En condiciones adecuadas, su vida media es de 3 a 5 años. Presentan una única aleta dorsal y barbillas frontales en los laterales de la boca. En sus flancos se distinguen cinco o más franjas horizontales reflectantes y pigmentadas en color azul, desde el opérculo hasta la cola. Poseen dimorfismo sexual en tamaño, morfología y coloración, luciendo los machos una tonalidad rojiza y una pigmentación más acentuada de sus bandas (Figura 2). Las hembras muestran una tonalidad más amarilla o blanca con menor pigmentación de sus bandas. Morfológicamente, los machos son más alargados mientras que las hembras muestran un vientre ovalado en el que se forman



los huevos, dando la sensación de ser más redondeadas. El rasgo más claro es la presencia de una papila genital localizada entre la aleta ventral y la anal en las hembras (Yossa, R., et al. 2013).

Desde hace décadas el pez cebra ha sido utilizado como modelo de experimentación, destacando como uno de los principales modelos en los campos de la Biología Molecular y del Desarrollo embrionario de vertebrados (Langheinrich, U., 2003). Su amplio uso en investigaciones se debe a un alto grado de homología genética con el ser humano, compartiendo un 70 % del genoma. Recientemente se ha demostrado su validez como organismo modelo para la búsqueda de nuevos fármacos, realizar ensayos farmacológicos, ecotoxicidad, estudios ADME-Tox o cáncer (Bopp et al. 2006). Por su similitud genética, los estudios realizados en pez cebra se pueden correlacionar con procesos biológicos en humanos. El pez cebra fue uno de los primeros vertebrados en clonarse, actualmente todo su genoma está secuenciado y existe un número elevado de cepas mutantes para diferentes fines.

Las hembras ponen huevos a la luz del día, se reproducen durante todo el año, y cada hembra es capaz de poner en torno a 200 huevos por puesta, por lo que se pueden analizar numerosos compuestos en un tiempo relativamente corto. El desarrollo del embrión es extremadamente rápido, y a las 72 horas ha terminado el desarrollo embrionario, permitiendo la obtención de resultados en tiempos más cortos e identificar la actividad biológica de los compuestos en las primeras fases del desarrollo. Los embriones son transparentes, por lo que no es necesario de realizar disecciones para observar el desarrollo de estructuras internas (Gonzalez-Nunez, V., & Rodríguez, R., 2009).

En comparación con ensayos *in vivo* en ratones o ratas, presentan un coste de mantenimiento menor, ya que no necesitan tantos requerimientos específicos, y en un pequeño espacio se pueden mantener numerosas peceras. Dado que los embriones se pueden desarrollar en un volumen mínimo y absorben los compuestos diluidos en el medio circundante a través de las branquias y la piel, se requieren menores cantidades de compuestos por ensayo, con lo que se reduce el gasto en fármacos (Langheinrich, U., 2003)

El uso de embriones de pez cebra tiene ventajas particulares en comparación con ensayos en cultivos celulares. En ocasiones, los fármacos utilizados *in vitro* pueden no ser efectivos *in vivo*, o bien no existen líneas celulares adecuadas para un ensayo determinado o no se aprecian efectos secundarios. Por tanto, queda demostrado que investigar con embriones de pez cebra permite realizar estudios *in vivo* con la facilidad de comprobar el efecto a nivel (sub)celular (Brennan, C.H., 2011).



**Figura 2.** Individuos de Pez cebra adultos: macho (inferior) y hembra (superior). La flecha negra indica la papila genital.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El dolor no sólo conlleva un componente subjetivo que modifica su percepción sensorial, sino además actualmente no se disponen de herramientas ni métodos fiables para su medición. Estas dificultades en la cuantificación del dolor hacen muy difícil establecer el tratamiento más adecuado, o realizar un seguimiento fiable de la evolución del paciente. Además, los modelos animales existentes para la evaluación de dolor y analgesia se basan principalmente en test comportamentales. Por tanto, sería necesario desarrollar un modelo bioquímico que permita cuantificar de una forma más objetiva el grado de dolor que produce un estímulo potencialmente doloroso.

El pez cebra puede ser un modelo muy útil para la realización de ensayos, dolor y analgesia dado que posee todos los componentes necesarios para percibir y procesar la sensación dolorosa. La bibliografía disponible demuestra que existen ensayos comportamentales con resultados similares a los observados en modelos murinos. Asimismo, el empleo de embriones de pez cebra permite reducir el uso de individuos adultos, tanto de pez cebra como de roedores, ya que las larvas desarrollan comportamientos específicos en respuesta a estímulos dolorosos. Por otra parte, la variación de la homeostasis de cualquier organismo supone cambios en la expresión de genes de expresión temprana (IEG), como es el gen *cfos*. Por tanto, si se someten los embriones a un estímulo potencialmente doloroso, sería factible observar variaciones en la expresión de *cfos*.

Teniendo en cuenta las premisas anteriores, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

*“Los embriones de pez cebra pueden ser empleados como una herramienta para cuantificar bioquímicamente la sensación dolorosa mediante el análisis de la expresión de *cfos*”*

Para ello, los embriones de pez cebra de 72 horas post-fecundación (hpf) serán expuestos a distintos estímulos potencialmente dolorosos de naturaleza diversa, tanto físicos, químicos como agentes farmacológicos. Los resultados esperables serían cambios en la expresión de *cfos* entre el grupo control y el expuesto a dicho estímulo.

Para verificar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Establecer la existencia de cambios comportamentales entre embriones de pez cebra control y los expuestos a estímulos potencialmente dolorosos.
2. Analizar la expresión de *cfos* y determinar la existencia de cambios entre los grupos control y tratamiento.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Mantenimiento de peces cebra adultos

Los peces cebra sexualmente maduros se mantienen en el estabulario del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL). Las peceras comparten un sistema de recirculación de agua basado en un proceso de filtrado mecánico y biológico manteniendo el agua oxigenada, limpia y a una temperatura estable ( $28.0 \pm 0.5$  °C). La esterilización del agua se realiza mediante una lámpara de luz ultravioleta reduciendo el crecimiento de microorganismos y la posible transmisión de enfermedades. Rutinariamente se realizan medidas de pH y nitritos, se ha establecido un fotoperiodo de acuerdo a su ritmo circadiano 14:10 (14 h de luz y 10 h de oscuridad), y las tareas de limpieza y alimentación se llevan a cabo diariamente. La separación de individuos por sexo es un proceso muy laborioso ya que los peces muestran una amplia gama de tonalidad desde rojizo, pardo, amarillo o blanco en función del sexo o edad. La línea de peces cebra utilizada para este trabajo es la cepa salvaje AB.

#### 3.2 Cruce, recogida huevos y cría de embriones

El experimento se inicia con el cruce de ejemplares adultos y cría de embriones. Se lleva a cabo colocando varias peceras de puesta, las cuales llevan incorporada una separación perforada que los huevos atraviesan y se depositan en el fondo, con lo que se evita su depredación. Se introducen en la misma pecera machos y hembras, en una proporción de 2 / 3, horas antes de que se inicie el fotoperiodo de noche. A la mañana siguiente, mediante la inducción por estímulo luminoso se lleva a cabo el desove y fecundación de los huevos. Los huevos fecundados se recogen con un colador y se depositan en placas Petri junto a un medio rico en sales y azul de metileno como bactericida (Medio E3: 5  $\mu$ M NaCl, 0.17  $\mu$ M KCl, 0.33  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 0.33  $\mu$ M MgSO<sub>4</sub> y azul de metileno, pH en un rango entre 8.7-7). Los huevos se observan al estereomicroscopio Zeiss Stereo Discovery.V8 separando con una lanceta los fecundados y desechando los malogrados o no fecundados. Los huevos se incuban en un incubador a la temperatura óptima de 28.5 °C (Kimmel et al., 1995) para el desarrollo adecuado hasta las 72 horas post-fecundación (hpf).

#### 3.3 Exposición a estímulos potencialmente dolorosos

Se distribuyen 50 embriones en placas multipocillo de 6 pocillos con volumen final de 6 mL de medio E3. En el experimento de exposición a distintas temperaturas, el grupo temperatura control se incuba 2 horas a 28.5 °C y el grupo experimental se incuba igualmente 2 h en otro incubador a 39 °C. Para el experimento de la variación del pH, se añade ácido acético al medio E3, de modo que el grupo experimental se expone a pH = 5.75, y el grupo control se incuba en medio E3 con pH en un rango entre 8.7 y 7. Ambos grupos se incuban 2 h a 28.5 °C, la temperatura óptima para el desarrollo.

#### 3.4 Exposición a fármacos potencialmente dolorosos

Se distribuyen 50 embriones de 72 hpf en placas estériles multipocillo de 6 pocillos. Los fármacos que se utilizan son capsaicina (CAS No: 404-86-4, Tocris) y kainato (CAS No: 487-79-6, Tocris) a

diferentes concentraciones seriadas a partir del stock en agua destilada, excepto en el caso de la capsaicina, ya que es insoluble en medio acuoso, por lo que se utiliza un solvente orgánico, el dimetil sulfóxido (DMSO 99.6%) a una concentración final (c.f.) del 1%. El volumen final es de 6 mL de E3 en cada pocillo, y se incuba durante 2 h (incubación aguda) a 28.5 °C. El estudio con kainato se organiza en cuatro grupos: tres grupos con el fármaco diluido en agua a concentraciones 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M y un control negativo (solo medio E3). El ensayo con capsaicina se organiza en cinco grupos: control negativo (sólo medio E3), control con 1% DMSO y tres grupos de concentración a 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M diluidos en 1% DMSO (c.f.).

### 3.5 Estudio comportamental y alteraciones en el ritmo cardiaco

Se analiza el comportamiento de los embriones de 72 hpf antes y después de la exposición a estímulos potencialmente dolorosos, y se valora la actividad locomotora, el comportamiento en el medio y el reflejo de huida. Asimismo se cuentan los latidos en un minuto de al menos 7 embriones por grupo experimental.

### 3.6 Obtención de muestras

Para la obtención de muestras se colocan las placas con los embriones durante unos minutos encima de hielo, que es el procedimiento anestésico y eutanásico elegido, ya que el empleo de anestésicos como la benzocaína podría enmascarar los resultados experimentales. Mediante una pipeta Pasteur se transfirieren los embriones del pocillo a un tubo eppendorf que también está incubado en hielo, y tras eliminar el medio sobrante, se congelan a -80 °C para su posterior análisis.

### 3.7 Extracción y cuantificación de proteínas

En cada muestra se añaden 70  $\mu$ L de tampón de extracción RIPA (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) e inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma) para evitar la degradación de las proteínas por enzimas celulares. Se procede a la extracción mecánica de proteínas por procedimiento manual mediante pistilos y jeringuillas de insulina. Las muestras homogenizadas se centrifugan 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf nuevo. La concentración de las proteínas del sobrenadante se cuantifica mediante el método Bradford.

### 3.8 SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras se hierven en el termobloque durante 7 minutos a 100 °C y se añade tampón de carga (4% SDS 10%, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 1.25 mL Tris 1M pH 6.8). Mediante una electroforesis en gel (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 9% se separan las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Se cargan 100  $\mu$ g de muestra por pocillo y se lleva a cabo la electroforesis, primero durante 20 min a 90V y posteriormente 2 h a 120V, utilizando el siguiente tampón de electroforesis: 25 mM Tris-base a pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1% de SDS. Las proteínas se transfirieren del gel a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) previamente

activadas con MEOH, durante 2 h a 220mA utilizando tampón de electrotransferencia (25 mM Tris-base a pH 8.3 y 192 mM glicina). Se verifica que la transferencia se produce correctamente mediante tinción con rojo Ponceau 0.1% en 5% de AcOH. Se inicia la inmunodetección con el bloqueo de las membranas 1 h a temperatura ambiente (RT) en agitación con BSA 3% (albúmina de suero bovino, Sigma) en TBSw (10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) para evitar uniones inespecíficas y falsos positivos. A continuación, las membranas se incuban con anticuerpo primario (*Rabbit policlonal C-Fos*, Ref.sc-253, Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:500 con BSA3% en TBSw) a 4 °C durante toda la noche (14-16 h). Las membranas se lavan tres veces durante 10 minutos con el tampón de lavado TBSw, y a continuación se procede con la incubación con el anticuerpo secundario (*Anti Rabbit HRP*, Ref.sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:10000) en disolución de leche en polvo desnatada (5%) en TBSw durante 45 minutos en oscuridad a RT. Por último, se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBSw en oscuridad a RT y se procede al revelado mediante quimioluminiscencia con luminol (*Western blotting detection kit*, Advansta) siguiendo las indicaciones del fabricante en el MicroChemi 4.2. Para limpiar la membrana de los anticuerpos se realiza un *stripping* en cuatro lavados de 10 minutos cada uno a RT, el primer lavado con TBSw, un segundo lavado con glicina 0.1 M pH 2.5, un tercer lavado con SDS1% y un último lavado con TBSw. Como control de carga y para poder normalizar los resultados de la cuantificación de la intensidad de las bandas de cfos se emplea la  $\beta$ -actina. Para su detección se realizan los mismos pasos expuestos anteriormente de bloqueo, incubación con anticuerpo primario (*Rabbit,  $\beta$ -actina*, Ref. 4967, Cell Signalling, dilución 1:1000 con BSA 3%), incubación de anticuerpo secundario, lavados y revelado.

### 3.9 Obtención de imágenes y cuantificación

El revelado de las membranas se realiza en el MicroChemi 4.2, en el que el software toma imágenes a diferentes tiempos y calidad. Se cuantifican las bandas de las imágenes con el programa Photoshop CS5 Extended y los cálculos se realizan en Excel, calculando la proporción de la intensidad de las bandas entre cfos y el control de carga ( $\beta$ -actina), y posteriormente se normalizan los datos respecto al grupo control para cada ensayo.

### 3.10 Análisis estadístico

Los resultados de la frecuencia cardiaca en el ensayo de variación de temperatura y de pH se analizan mediante el test t, mientras que los datos obtenidos para la incubación con capsaicina se analizan con el test ANOVA de una vía y el post-test de Tukey.

En el caso de los datos obtenidos de la cuantificación de la intensidad de bandas de Western Blot, se realiza un test-t no pareado, incluyendo la corrección de Welch cuando ha sido necesaria, o bien mediante un ANOVA de una vía con el post-test de Tukey. Todos los datos han sido analizados mediante el programa GraphPad Prism 5 donde se indica significación estadística para  $p \leq 0.001$  (\*\*\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.05$  (\*).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estudio comportamental

Las larvas de pez cebra de 72 hpf, tras las dos horas de exposición a la máxima concentración de capsaicina (100  $\mu$ M), se dispusieron agrupadas en el centro del pocillo. No presentaron actividad locomotora, dado que se encontraban estáticas en posición lateral. Se comprobó que el reflejo de huida estaba limitado, y únicamente se impulsaban ligeramente, intentándose elevar hacia la superficie, pero sin conseguir desplazarse. Por el contrario, las larvas de otras concentraciones se situaron cerca de la pared del pocillo, y algunas nadaban en el medio. No había indicios de que el reflejo de huida estuviera disminuido, ya que se desplazaban por el pocillo de manera similar a los controles. Las larvas incubadas a pH 5.75 y las incubadas a temperatura a 39 °C no mostraron diferencias comportamentales respecto a los controles.

### 4.2 Estudio de la frecuencia cardiaca

#### 4.2.1 Alteraciones de la frecuencia cardiaca en función a la variación de temperatura

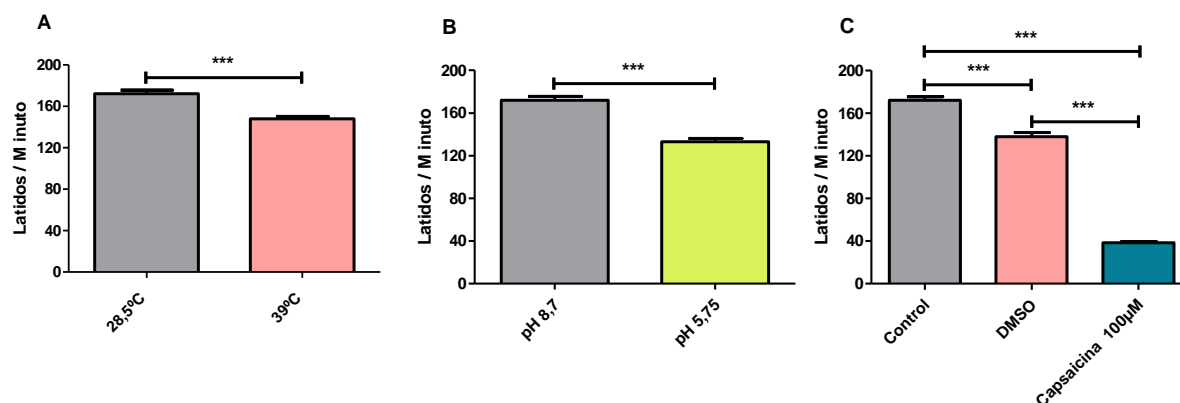
Se contabilizaron los latidos por minuto de los embriones a temperatura óptima para el desarrollo y a la temperatura elevada de 39 °C. Tras el análisis estadístico mediante el test-T, se puede apreciar una disminución significativa en la frecuencia cardiaca en el grupo incubado a 39 °C ( $\leq 14\%$ ) frente a los controles (Figura 3A).

#### 4.2.2 Alteraciones de la frecuencia cardiaca en función a la variación de pH

Los datos de frecuencia cardiaca en embriones expuestos a pH control (8.7) y a pH 5.75 se analizaron mediante un test-T, revelando una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia cardiaca entre el grupo a pH 5.75 ( $\leq 22\%$ ) y el grupo control (Figura 3B).

#### 4.2.3 Alteraciones de la frecuencia cardiaca tras la incubación con capsaicina

La frecuencia cardiaca fue evaluada en los embriones del grupo control, del grupo incubado con 1% DMSO y del grupo incubado en presencia de capsaicina 100  $\mu$ M. Los resultados analizados mediante el test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tuckey, demostraron que la frecuencia cardiaca disminuye un 20% tras la incubación con 1% DMSO en comparación con los controles. Las larvas incubadas con capsaicina en su máxima concentración presentaron una bradicardia severa así como arritmias, disminuyendo la frecuencia cardiaca  $\leq 77\%$  y  $\leq 72\%$  en comparación con el grupo control y 1% DMSO respectivamente (Figura 3C). La circulación sanguínea en la arteria dorsal se redujo al ritmo del corazón, mientras que la corriente de retorno se mantuvo constante. No se apreciaron diferencias destacables en la circulación sanguínea en el resto de los grupos tratados con menores concentraciones de capsaicina.



**Figura 3. Alteraciones de la frecuencia cardiaca entre embriones control y embriones expuestos a estímulos potencialmente dolorosos.** (A) Representación de la media y el error estándar de la media (SEM) de la frecuencia cardiaca de los embriones tras la incubación a diferentes temperaturas. Los latidos por minuto a temperatura de 28.5°C =  $172 \pm 3.519$ , y los latidos por minuto a temperatura 39 °C =  $147.9 \pm 2.454$ . Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) entre ambas muestras (diferencia en la frecuencia cardiaca de  $24.14 \pm 4.290$  latidos por minuto). (B) Representación gráfica de la media y SEM de la frecuencia cardiaca tras la incubación a dos pH distintos. Los latidos por minuto a pH 8.7 =  $172 \pm 3.519$  y pH 5.75 =  $133 \pm 3.078$ . Existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) entre ambos grupos (diferencia en la frecuencia cardiaca de  $39 \pm 4.675$  latidos por minuto). (C) Representación de la media y SEM de la frecuencia cardiaca de los embriones del grupo control ( $172 \pm 3.519$  latidos por minuto), incubados con 1% DMSO ( $138 \pm 3.879$  latidos por minuto) e incubados con capsaicina ( $38.57 \pm 1.088$ ), existiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) entre los grupos capsaicina control (diferencia en la frecuencia cardiaca de  $34.00 \pm 5.237$  latidos por minuto) y DMSO y capsaicina (diferencia en la frecuencia cardiaca de  $133.4 \pm 3.683$  latidos por minuto).

#### 4.3 Análisis de la expresión de cfos

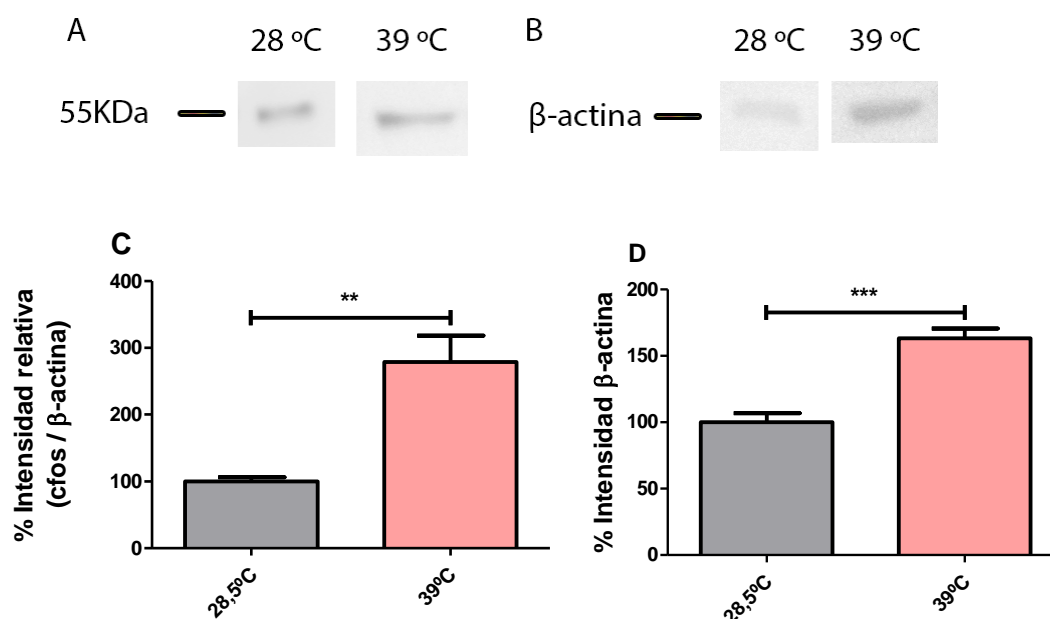
Las imágenes obtenidas tras el revelado de las membranas de Western Blot se cuantificaron, y se obtuvo la intensidad de las diferentes bandas: la banda de 55KDa que representa cfos, así como la banda de 43KDa, que se corresponde con fra1 y fra2, otros genes de la familia fos. Posteriormente se cuantificó la intensidad de la  $\beta$ -actina, que se empleó como control de carga. En total, el tamaño de muestra para cada condición estudiada fue  $N \geq 6$ . Los datos obtenidos de las bandas detectadas con el anticuerpo anti-(pan)-fos se normalizaron con el control de carga  $\beta$ -actina, por lo que los datos representados muestran la proporción cfos /  $\beta$ -actina; posteriormente se calculó el porcentaje de variación respecto del control. Para el análisis estadístico, en los ensayos de variación de temperatura y pH realizaron test-T con corrección Welch, ya que las varianzas eran diferentes para cada grupo experimental. En los experimentos de exposición a fármacos, los datos se analizaron mediante el test ANOVA de una vía con el post-test de Tukey.

##### 4.3.1 Análisis de la expresión de cfos en función a la variación de temperatura

Los resultados del análisis de la expresión de cfos en los grupos incubados a diferentes temperaturas muestran un aumento estadísticamente significativo de la proporción cfos /  $\beta$ -actina en el grupo incubado a 39 °C frente al grupo incubado a la temperatura óptima para el desarrollo. No obstante, es necesario destacar un aumento de en la proporción de la  $\beta$ -actina en el grupo incubado a temperatura



elevada respecto al grupo control (Figura 4), por lo que la sobreexpresión real de cfos en el grupo incubado a 39 °C será mayor que la que reflejan los datos normalizados.



**Figura 4. Expresión de cfos en embriones control y expuestos a temperatura elevada.** (A) Imagen representativa de la expresión de cfos en muestras incubadas a distintas temperaturas. (B) Imagen de la expresión de la β-actina en las muestras anteriores. (C) Análisis de la expresión de cfos, expresada como la media ± SEM del porcentaje de la intensidad relativa (cfos / β-actina), del grupo control incubado a temperatura 28.5 °C (% = 100.0 ± 6.181) y del grupo incubado a temperatura 39 °C (% = 336.5 ± 24.15). Se observa un aumento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.01$ ) en el grupo incubado a 39 °C (aumento en % = 236.6 ± 24.93). (D) Análisis de la expresión de la β-actina (porcentaje expresado como la media ± SEM) en el grupo incubado a 39 °C (% = 163.3 ± 7.177) y en el grupo control a 28.5 °C (% = 100.0 ± 6.753), observándose diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.001$ ) entre sus medias (aumento en % = 63.33 ± 10.27).

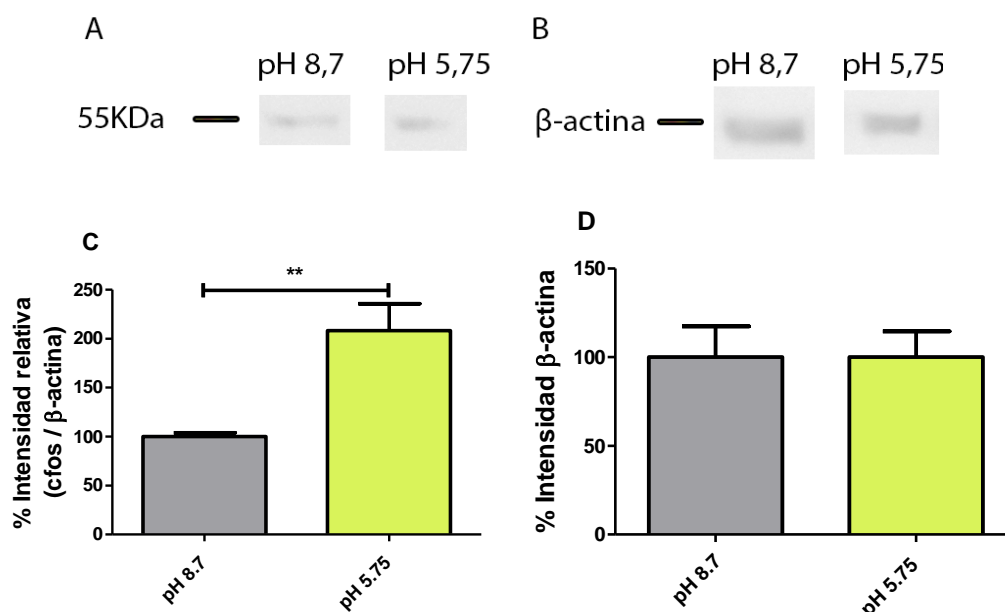
#### 4.3.2 Análisis de cfos en función a la variación de pH

Con la finalidad de observar posibles diferencias entre los grupos incubados a distinto pH se realizó el análisis la expresión de cfos por Western Blot. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la proporción cfos / β-actina en el grupo incubado a pH 5.7 respecto al grupo incubado a pH 8.7 (Figura 5). Por otra parte, al contrario de lo sucedido con la incubación a distintas temperaturas, la expresión de la β-actina se mantuvo constante.

#### 4.3.3. Análisis de expresión de cfos en embriones control y expuestos a kainato

Después de analizar los resultados de la expresión de cfos en embriones expuestos a kainato, la intensidad relativa de la banda de 55KDa, que corresponde con cfos, fue muy similar a la observada para el grupo control, excepto en las muestras expuestas a la dosis kainato 1 μM cuya expresión aumentó (≤83%). Todos los grupos revelaron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo kainato 1 μM (Figura 6, Figura 7A). Atendiendo a la expresión de fra1-fra2, que se corresponde con la banda de 43KDa, la proporción entre fra1-fra2 / β-actina se mantuvo constante en todos los grupos experimentales, por lo que no se distingue ninguna diferencia significativa tras el análisis estadístico (Figura 7B).

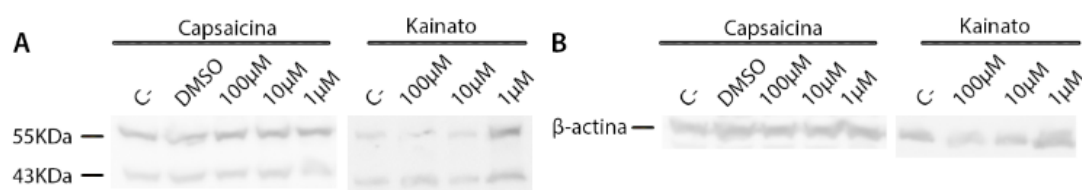




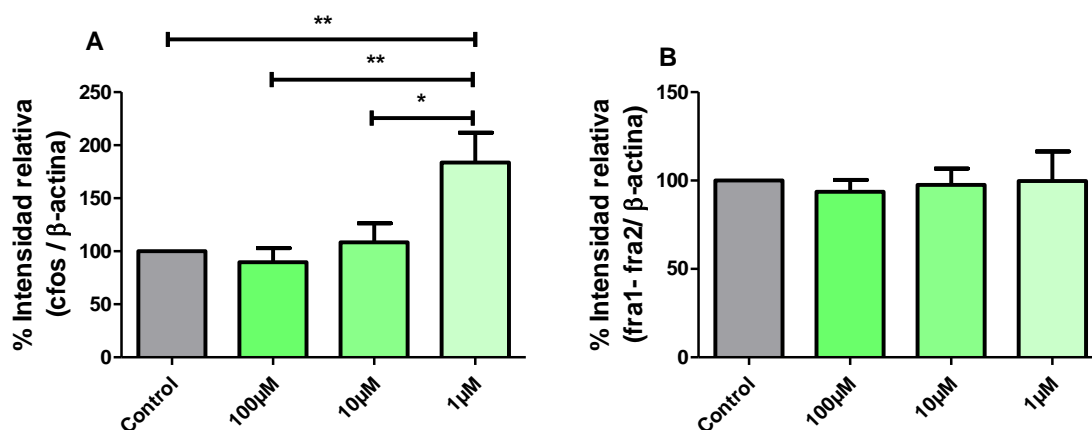
**Figura 5. Expresión de c-fos en embriones control y expuestos a pH bajo.** (A) Imagen representativa de la expresión de c-fos en muestras incubadas a distinto pH. (B) Imagen representativa de la β-actina para las muestras anteriores. (C) Análisis de la expresión de c-fos, expresada como la media ± SEM del porcentaje de la intensidad relativa (cfos / β-actina), del grupo control incubado a pH 8.7 (% = 100.0 ± 3.849) y el grupo incubado a pH 5.75 (% = 208.2 ± 27.47). Se observa un aumento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.01$ ) en el grupo incubado a pH 5.75 (aumento en % = 108.2 ± 27.74). (D) Análisis de la expresión de la β-actina (porcentaje expresado como la media ± SEM) en el grupo incubado a pH 8.7 (% = 100.0 ± 17.41) y en el grupo incubado a pH 5.75 (% = 100 ± 14.61), donde no se aprecian diferencias significativas entre ambos grupos.

#### 4.3.4. Análisis de expresión de c-fos en embriones control y expuestos a capsaicina

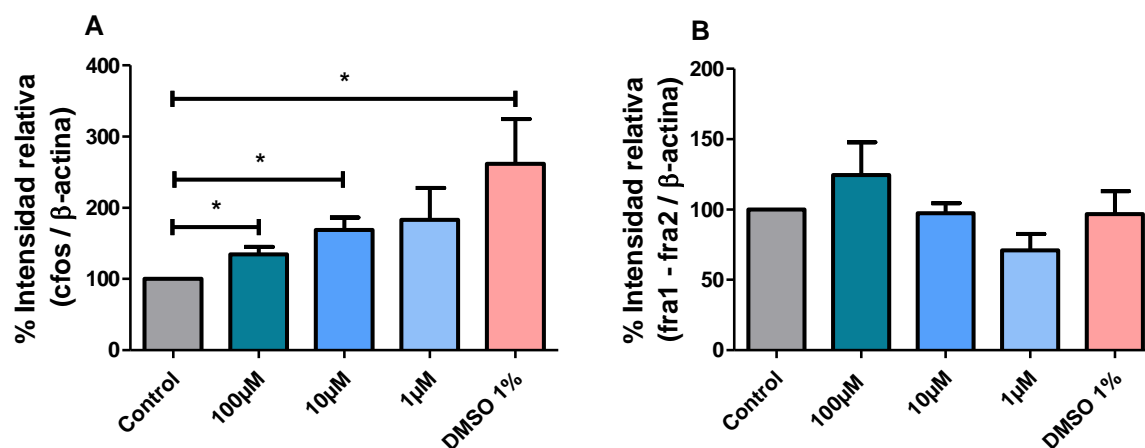
El análisis de la expresión de c-fos en embriones incubados a distintas concentraciones de capsaicina reveló un aumento en la intensidad relativa de c-fos (banda de 55KDa) para todas las dosis de capsaicina respecto del control (Figura 6, Figura 8A). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para la dosis de mayor concentración, pero no para la dosis de 1 μM; esto es debido, probablemente, a la mayor variabilidad de los datos obtenidos para la concentración 1 μM. Además, es necesario, destacar la sobreexpresión de c-fos en los embriones incubados solamente con 1% DMSO ( $\leq 161\%$ ) y sin capsaicina. Por otra parte, a diferencia de la incubación con kainato, la expresión de fra1-fra2 / β-actina (banda de 43KDa) ha sido más variable. Mientras: la expresión aumentó en el grupo incubado con capsaicina 100 μM, ésta es similar a la del grupo control para el grupo expuesto a 10 μM y para el grupo incubado sólo con 1% DMSO, y disminuyó en el grupo tratado con capsaicina 1 μM. (Figura 8B). No obstante, estas diferencias no han sido estadísticamente significativas.



**Figura 6. Análisis de la expresión de c-fos en embriones control, incubados con 1% DMSO y distintas concentraciones de kainato y capsaicina.** (A) Imagen representativa de la expresión de c-fos (banda de 55KDa) y fra1-fra2 (banda de 43KDa). (B) Imagen representativa de la β-actina en las muestras anteriores.



**Figura 7.** Expresión de cfos (que corresponde con la banda 55KDa), y de fra1-fra2 (que corresponde con la banda de 43KDa) en embriones control y expuestos a distintas concentraciones de kainato. **(A)** Expresión de cfos, indicada como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de la intensidad relativa (cfos /  $\beta$ -actina), del grupo control y de los grupos incubados con distintas concentraciones de kainato: 100  $\mu$ M (% = 90.00  $\pm$  12.93), 10  $\mu$ M (% = 108.4  $\pm$  18.21) y 1  $\mu$ M (% = 183.7  $\pm$  28.18). Se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medias del grupo incubado con 1  $\mu$ M de kainato y el resto de los grupos experimentales. **(B)** Expresión de fra1 y fra2, expresada como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de la intensidad relativa (fra1-fra2 /  $\beta$ -actina), del grupo control y de los grupos incubados con distintas concentraciones de kainato: 100  $\mu$ M (% = 93.64  $\pm$  6.755), 10  $\mu$ M (% = 97.57  $\pm$  9.215) y 1  $\mu$ M (% = 99.69  $\pm$  16.70). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos experimentales.



**Figura 8.** Expresión de cfos (que corresponde con la banda 55KDa), y de fra1-fra2 (que corresponde con la banda de 43KDa) en embriones control, 1% DMSO y expuestos a distintas concentraciones de capsaicina. **(A)** Expresión de cfos, expresada como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de la intensidad relativa (cfos /  $\beta$ -actina) del grupo control, grupo incubado con 1% DMSO (% = 261.8  $\pm$  63.06), grupo incubado con capsaicina 100  $\mu$ M (% = 134.5  $\pm$  10.65), grupo incubado con capsaicina 10  $\mu$ M (% = 168.8  $\pm$  17.52) y del grupo incubado con capsaicina 1  $\mu$ M (% = 183.1  $\pm$  44.80). El análisis estadístico revela diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de los grupos excepto el tratado con capsaicina 1  $\mu$ M. **(B)** Expresión de fra1-fra2, expresada como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de la intensidad relativa (fra1-fra2 /  $\beta$ -actina) del grupo control, grupo incubado con 1% DMSO (% = 96.77  $\pm$  16.37), grupo incubado con capsaicina 100  $\mu$ M (% = 124.6  $\pm$  23.08), grupo incubado con capsaicina 10  $\mu$ M (% = 97.37  $\pm$  7.097) y del grupo incubado con capsaicina 1  $\mu$ M (% = 71.08  $\pm$  96.77). No se muestran diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos experimentales.

## 5. DISCUSIÓN

En 1979 la IASP definió el dolor siguiendo dos aspectos *“El primero, la sensación dolorosa viaja a través de los nervios sensoriales aferentes que transmiten la información a las partes relevantes de la médula espinal y el cerebro. El segundo es tener una respuesta emocional asociada o un estado afectivo negativo equivalente a sentimiento de incomodidad y sufrimiento, desencadenando nuevos comportamientos acompañado normalmente de modificaciones fisiológicas como la liberación de hormonas de estrés, inflamación, respuestas cardiovasculares, etc., motivando al individuo a buscar alivio del dolor”* (Sneddon, L., 2011).

Debido a las diferentes dimensiones que componen la sensación dolorosa, es difícil definirla en los seres humanos, por lo que es aún más complicada de evaluar en los animales. Obviando el componente afectivo-emocional del dolor, Zimmerman en 1986 define el dolor en animales como *“Una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas, desencadenando un comportamiento aprendido de evitación y que puede modificar comportamientos específicos de la especie, incluyendo los sociales”* Es decir, la percepción del dolor es un sistema que alerta al individuo de un peligro o daño y lo motiva a protegerse. En nuestro caso, el pez cebra presenta un sistema nervioso capaz de detectar y procesar la sensación dolorosa, y los individuos son capaces de llevar a cabo respuestas comportamentales y fisiológicas *in vivo* frente a estímulos potencialmente dolorosos (Sneddon, L., 2011).

A causa de su distancia evolutiva, existen detractores del uso de peces en la investigación en dolor, pero la mayoría de investigadores aceptan que el dolor debería haber evolucionado en los distintos grupos vertebrados de manera similar a otros sistemas sensoriales (Sneddon, L., 2011). De hecho, se ha estudiado la percepción del dolor en otros modelos animales como en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) donde los peces tratados mostraban comportamientos equivalentes a los observados en mamíferos como respuesta a estímulos dolorosos (Gonzalez-Nunez, V., & Rodríguez, R., 2009). Otras investigaciones han identificado subtipos de nociceptores en el pez cebra, lo que sugiere una organización molecular de los circuitos nociceptivos similar entre mamíferos y pez cebra, incluso en etapas tempranas de desarrollo, como son entre 1 y 3 dpf (Lopez-Luna et al., 2017). Es más, estos mismos autores han demostrado que el pez cebra responde a una amplia gama de estímulos dolorosos como estímulos térmicos, químicos y eléctricos. (Lopez-Luna et al., 2017).

Por otra parte, se ha demostrado que las larvas de pez cebra muestran variaciones comportamentales frente a estímulos dolorosos similares a los individuos adultos (Sneddon, L., 2011), lo que indica que existe la posibilidad de reemplazar los individuos adultos por los de etapas más tempranas. De esta manera se cumple la premisa de reemplazo de las 3R solicitadas por los comités de Bioética. Además, la utilización de larvas permite un *screening* de un mayor número de compuestos en un periodo de tiempo más corto, ya que no es necesario que los individuos sean sexualmente maduros.

Estudios previos han demostrado que los embriones de pez cebra se desarrollan normalmente si se mantienen dentro de un rango de temperatura de ocho grados, entre 25 °C a 33 °C, pero fuera de estos extremos pueden generarse anomalías en el embrión, variando las tasas de desarrollo y no necesariamente de manera coordinada (Kimmel et al., 1995). Otras investigaciones indican que embriones incubados a la temperatura más alta tolerable (48 °C) presentan características similares a modelos animales mamíferos en cuanto a sufrimiento, degeneración nerviosa, quemaduras en la piel, estrés celular o apoptosis, lo que sugiere que los mecanismos del dolor se han conservado a lo largo de la evolución considerando al pez cebra un modelo adecuado para estudios de dolor (Malafoglia et al., 2014). Cuando las larvas son sometidas a un estímulo térmico nocivo, ya sea cálido o frío, muestran un incremento de la actividad locomotora. En este trabajo no se ha podido comprobar dicha respuesta comportamental, dado que la incubación a 39 °C se produce en el interior una incubadora; por tanto, ha sido imposible realizar un seguimiento si se quería mantener a los embriones a temperatura constante durante las 2 h de incubación.

En relación a la incubación de embriones de pez cebra a pH bajo, se conoce que pueden experimentar estrés, daño en las branquias y epidermis (Lopez-Luna et al., 2017). Investigaciones recientes utilizando ácido acético e incubando embriones en medio ácido (pH entre 3.6 a 3.1) indicaron una reducción de la actividad locomotora a pH 3.1, y un aumento de la actividad locomotora a pH 3.6 (Lopez-Luna et al., 2017), lo que sugiere una respuesta refleja de huida o retirada frente a un estímulo potencialmente nocivo. En el presente experimento se ha descendido el pH del medio E3 mediante ácido acético hasta llegar a pH 5.75, ya que una disminución mayor del pH podría afectar a la integridad de los embriones, y por tanto, enmascarar otros resultados. No obstante, no hemos podido comprobar una variación de la actividad locomotora en respuesta a dicho pH, aunque sí cambios en la expresión de cfos.

Cuando se produce un evento estresante, ambiental o fisiológico, el organismo responde mediante el aumento de la transcripción de genes de proteína de estrés o HSP (*Heat Shock Proteins*). La expresión de proteínas de choque térmico se considera un biomarcador efectivo de la respuesta nociva de un organismo expuesto a factores estresantes, ya sean ambientales o fisiológicos (Hallare, A., et al. 2006). En el caso del ensayo con variación de temperatura, el aumento de la temperatura provoca un aumento de expresión de proteínas de choque térmico (HSP) con un aumento concomitante de la  $\beta$ -actina, nuestro control de carga en los experimentos de Western Blot. Por consiguiente, nuestro experimento de incubación de los embriones a temperatura control (28.5 °C) y a temperatura elevada (39 °C) no es una aproximación eficaz para determinar la sobreexpresión de la expresión de cfos mediante la variación de la temperatura. No obstante, es un buen indicador de que aumentos en la expresión de cfos en embriones de pez cebra pueden ser fácilmente detectables por Western Blot.

En los análisis de los datos obtenidos tras la exposición de los embriones a variaciones de pH, se aprecia que la disminución de pH aumenta la expresión de cfos respecto al control. Al contrario que lo ocurrido con el ensayo de variación de temperatura, no aumenta la expresión del control de carga, siendo la expresión de  $\beta$ -actina similar entre el grupo control y el incubado a pH 5.75. Por tanto, la exposición de embriones a un pH de 5.75 podría emplearse para determinar cambios en la expresión de cfos ante un estímulo potencialmente doloroso, sin ser necesario emplear condiciones tan agresivas (pH = 3.1-3.6) como las utilizadas por el grupo de Sneddon (Lopez-Luna et al., 2017).

En relación a la exposición de embriones a fármacos que pueden producir una sensación dolorosa, se conoce que las larvas de pez cebra absorben fácilmente compuestos de bajo peso molecular diluidos en el medio circundante, a través de las branquias y la piel (Langheinrich, U., 2003). La capsaicina es insoluble en medio acuoso, por lo que es necesario utilizar un solvente orgánico que sea lo menos embriotóxico posible. De acuerdo con la bibliografía nos decantamos por elegir el DMSO (dimetil sulfóxido) al 1% como solvente, muy utilizado en bioensayos celulares y con pez cebra (Maes et al., 2012). En comparación con otros solventes como el etanol, no muestra una disminución en la tasa de supervivencia y tiene menos efectos secundarios como una menor pigmentación, menor tasa de latido o edema si la concentración no sobrepasa el 1.5%, que es la concentración máxima tolerada a 3 dpf (Maes et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que es un potente inductor de proteínas de estrés (Hallare, A. et al. 2006). La tolerancia de los embriones a las diferentes concentraciones de DMSO depende de la fase del desarrollo en la que se añada el solvente, ya que los embriones muestran mayor tolerancia a concentraciones elevadas durante las fases del desarrollo más tardías (William Detrich, H., et al. 2004).

Estudios comportamentales con el pez cebra han descrito el fenómeno de tigmotaxis como la evitación del centro de un entrono nuevo prefiriendo permanecer cerca de la pared, siendo un indicador utilizado como respuesta conductual frente al miedo o ansiedad en el adulto y en larvas (Lopez-Luna et al., 2017). Para realizar dichos estudios, las larvas han de mantenerse durante unos minutos a la luz del estereomicroscopio para que se adecúen a ella, y al someterlas al estímulo luminoso se disponen en los laterales del pocillo. Todos los grupos incubados con fármacos potencialmente dolorosos, al igual que los grupos control, mostraron este comportamiento excepto los incubados con capsaicina a concentración 100  $\mu$ M, colocándose en el centro debido al efecto del fármaco. Por lo tanto, los embriones de pez cebra incubados con la máxima dosis de capsaicina muestran un comportamiento que podría enmarcarse dentro de las respuestas conductuales asociadas a la percepción de un estímulo doloroso.

Los datos obtenidos en la exposición de los embriones a diferentes dosis de capsaicina y el solvente 1% DMSO muestran un aumento de la expresión de cfos inversamente proporcional a la dosis de capsaicina; es decir, se aprecian mayores aumentos en la expresión de cfos en el grupo expuesto a 1

$\mu\text{M}$  capsaicina que en los grupos incubados a  $10\ \mu\text{M}$  y  $100\ \mu\text{M}$ . Es posible una respuesta bifásica pero los datos han sido muy variables, por lo que no se puede concluir tal aseveración. Además, la sobreexpresión de cfos inducida exclusivamente por el solvente (DMSO al 1%) podría hacer difícil la interpretación de resultados en futuros test de dolor y analgesia. En el caso de la exposición al kainato se observa un aumento en la expresión de cfos en la dosis de menor concentración en comparación al resto de grupos. En este caso también podemos sugerir que se debe a una respuesta bifásica del fármaco, es decir, una estimulación de la expresión de cfos por dosis bajas y una inhibición de la respuesta a las dosis altas. Este fenómeno, también conocido como hormesis ha sido ampliamente descrito para fármacos y contaminantes, y a diferencia de los experimentos con capsaicina, los datos experimentales no han sido tan variables y permiten concluir que la expresión de cfos en embriones tratados con kainato sigue el patrón de una respuesta bifásica. En ningún caso hemos encontrado diferencias en la expresión de fra1-fra2 (banda de 43KDa) como respuesta ante la existencia de un estímulo potencialmente doloroso, por lo que solamente cfos (banda de 55KDa) podría ser considerado como biomarcador de activación del sistema nociceptivo.

Los datos aquí descritos indican que la activación del sistema nociceptivo del pez cebra en respuesta a un agente o estímulo potencialmente nocivo, implica un aumento en la expresión de cfos, y que dicha sobreexpresión puede ser cuantificada por Western Blot. Por tanto, creemos que la exposición de los embriones de 72 hpf a kainato, sería el modelo más consistente de exposición a fármacos, siendo la dosis  $1\ \mu\text{M}$  aquella seleccionada como la dosis más prometedora.

Por otra parte, en relación a los modelos propuestos de exposición de los embriones a estímulos potencialmente dolorosos, el modelo de incubación a pH 5.75 sería el modelo más sólido y equilibrado en la respuesta bioquímica, medida como sobreexpresión de cfos. No obstante, la concentración mínima de ácido necesaria para provocar una variación significativa en la actividad locomotora del pez cebra no ha sido establecida. El test del ácido acético ha sido realizado como referencia de modelo del dolor y nocicepción en peces adultos, entre ellos el pez cebra (Lopez-Luna et al., 2017) y se demostró que las larvas generan una respuesta conductual después del tratamiento con ácido disuelto en el agua, lo que sugiere que podría ser un buen modelo para estudios de dolor y nocicepción. Sin embargo, este estudio demuestra que la respuesta comportamental difiere en función al ácido utilizado, ya que cuando larvas de 5 dpf se incubaron a pH bajo (hasta 3.1) mediante la adición de ácido cítrico o acético la respuesta fue diferente, mientras el ácido acético indujo una reducción en la actividad locomotora, las larvas incubadas con ácido cítrico aumentaron su actividad locomotora (Lopez-Luna et al., 2017). Por otra parte, estos autores se limitan a realizar estudios comportamentales que no están respaldados por datos bioquímicos. En nuestro trabajo aportamos dichos datos moleculares, por lo que consideramos que la exposición al pH es un modelo consistente para continuar desarrollando un modelo de cuantificación del dolor.

Por lo tanto, una de las posibles vías futuras para la mejora del modelo de cuantificación objetiva del dolor mediante el uso del pez cebra, sería optimizar el modelo de variación de pH comparando los resultados de expresión de cfos con ácido acético y con ácido cítrico. Esta variación de comportamiento en función al ácido utilizado sugiere que están interviniendo distintos sistemas de neurotransmisión en la exposición a la variación de pH del medio.

El próximo paso a realizar para complementar y mejorar la cuantificación objetiva del dolor utilizando como modelo el pez cebra, sería la utilización de fármacos analgésicos, como la morfina. Es decir, se establecerían grupos experimentales control, tratados con estímulo doloroso (pH ácido o exposición a kainato 1  $\mu$ M) y un nuevo grupo preincubado con morfina y tratado con el estímulo doloroso. De ésta manera se podría establecer si la morfina ejerce un efecto analgésico, que se reflejaría en una reducción de la sobreexpresión de cfos en embriones expuestos a estímulos potencialmente dolorosos y tratados simultáneamente con morfina.

## 6. CONCLUSIONES

Los objetivos que se plantearon para desarrollar este trabajo de investigación culminan con nuestra aportación al desarrollo de un modelo bioquímico para cuantificar el dolor. Tras realizar este trabajo hemos podido alcanzar todos los objetivos propuestos y llegar a las siguientes conclusiones:

1°. El pez cebra puede considerarse buen modelo para desarrollar experimentos con estímulos potencialmente dolorosos, ya que la exposición aguda a dichos estímulos genera una respuesta al dolor, tanto comportamental como molecular, equivalente a la observada en modelos mamíferos.

2° La exposición aguda de embriones de pez cebra de 72 hpf a agentes o estímulos potencialmente dolorosos produce un aumento en la expresión del gen de expresión temprana cfos.

3°. La incubación a pH bajo (5.75) y a una concentración de kainato de 1  $\mu$ M son las aproximaciones más válidas para generar una sobreexpresión de cfos como respuesta a la activación del sistema nociceptivo en embriones de pez cebra.

La realización de futuros experimentos que completen este trabajo, nos permitirán desarrollar este método como la primera herramienta capaz de cuantificar objetivamente el dolor en pez cebra.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bopp, S. K., Minuzzo, M., & Lettieri, T. (2006). The Zebrafish ( *Danio rerio* ): an Emerging Model Organism in the Environmental Field. *Institute for Environmental and Sustainability, European Commission, Eur* 22598, 1–19.
- Brennan, C. (2011). Zebrafish behavioural assays of translational relevance for the study of psychiatric disease. *Neuroscience*, 22(1), 37–48. <http://doi.org/10.1515/RNS.2011.006>.
- Cassey, G. (2011). Pain -th fifth vital sing. *Nurs N Z*, 17(5), 24–9.
- Cerveró, F., & Laird, J. (1991). One pain or many pains? A new look at pain mechanisms. *News in Physiological Sciences*, 6, 268–273.
- Cerveró, F. (2008). Neuroplasticidad y Dolor. *Revista El Dolor*, 50(1), 44–48. Retrieved from [http://www.ached.cl/upfiles/revistas/documentos/49e39e778f178\\_colabespeciales\\_cervero.pdf](http://www.ached.cl/upfiles/revistas/documentos/49e39e778f178_colabespeciales_cervero.pdf)
- Gonzalez-Nunez, V., & Rodríguez, R. E. (2009). The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 50(4), 373–386. <http://doi.org/10.1093/ilar.50.4.373>
- Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H. R., & Triebkorn, R. (2006). Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 378–388. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.006>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310. <http://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Langheinrich, U. (2003). Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays*, 25(9), 904–912. <http://doi.org/10.1002/bies.10326>
- Lopez-Luna, J., Al-Jubouri, Q., Al-Nuaimy, W., & Sneddon, L. U. (2017). Reduction in activity by noxious chemical stimulation is ameliorated by immersion in analgesic drugs in zebrafish. *The Journal of Experimental Biology*, 220(8), 1451–1458. <http://doi.org/10.1242/jeb.146969>
- Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O. E., de Witte, P. A. M., Esguerra, C. V., & Crawford, A. D. (2012). Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS ONE*, 7(10), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043850>
- Malafoglia, V., Colasanti, M., Raffaeli, W., Balciunas, D., Giordano, A., & Bellipanni, G. (2014). Extreme thermal noxious stimuli induce pain responses in zebrafish larvae. *Journal of Cellular Physiology*, 229(3), 300–308. <http://doi.org/10.1002/jcp.24447>
- Merskey, H. (2007). The taxonomy of Pain. *Medical Clinics of North America*, 91(1), 13–20. <http://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.10.009>
- Micó, J. A., & Ortega-Álvaro, A. (2006). I Simposio de Dolor en Reumatología, *Reumatología Clínica*, 7–9.
- Nestler, E. J., Barrot, M., & Self, D. W. (2001). DeltaFosB: A sustained molecular switch for addiction, 98(20), 11042–11046.
- Sneddon, L. U. (2011). Pain Perception in Fish. *Journal of Consciousness Studies*, 18, 209–229.
- William Detrich, H; Westerfield, Monte; I. Zon, L. (Ed.). (2004). *The Zebrafish: Cellular and Developmental Biology* (2nd ed.). Elsevier.
- Yossa R, Sarker PK, Proulx E, Saxena V, Ekker M, V. G. (2013). A practical approach for sexing zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Aquaculture*, 25(2), 148–153. <http://doi.org/10.1080/10454438.2013.792170>